تولیدات دامی
دوره ۲٤ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱٤۰۱
صفحه‌های ۳۸۲-۳۷۳
DOI: 10.22059/jap.2022.337624.623671

مقاله پژوهشی

تأثیر القای کبد چرب با تزریق استرادیول بر بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت به انسولین در کبد مرغ‌های تخم‌گذار پس از اوج تولید

عیسی دیرنده[۱*]، محمد کاظمی فرد[۱]، طناز صابری‌فر[۲]
۱. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.
۲. دانش‌آموخته دکتری، گروه ژنتیک و فیزیولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۱/۲۰

چکیده

برای بررسی تأثیر کبدچرب بر مقاومت به انسولین در کبد مرغ‌های تخم‌گذار آزمایشی با استفاده از ۸۰ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه تجاری های لاین (w-36) پس از اوج تولید (سن ٤۳ هفته) به‌مدت هشت هفته در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل گروه شاهد (بدون تزریق) و گروه استرادیول (تزریق دو میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن استرادیول بنزوات) بود. تزریق استرادیول ۱۷ بتا به جهت القای بیماری کبد چرب، از هفته سوم آزمایش آغاز و سه بار در هفته و به‌مدت ۲۱روز انجام شد. خون‌گیری جهت بررسی غلظت تری‌گلیسرید، کلسترول و آنزیم‌های آلکالین‌فسفاتاز (ALP)، آسپارتات‌آمینوترانسفراز (AST) وآلانین‌آمینوترانسفراز (ALT) در انتهای آزمایش با استفاده از ۲۰ قطعه از هر تیمار انجام شد. در انتهای آزمایش پنج قطعه از هر تیمار انتخاب و کشتار شد سپس بافت کبد برای بررسی بیان ژن‌های گیرنده انسولین (InR)، ناقل گلوکز شماره ۱ (Glut1)، پروتئین تنظیم‌کننده انتقال استرول (SREBP1)، کیناز ۱ریبوزمی S6 (S6K1)، هدف راپامایسین (TOR)، پروتئین O1 جعبه (FOXO1) استفاده شد. نتایج نشان داد تزریق استرادیول سبب ایجاد کبد چرب شد و در این مرغان غلظت پلاسمایی تری‌گلیسرید، کلسترول و فعالیت AST، ALT و ALP افزایش یافت. در مرغان مبتلا به کبد چرب بیان ژن‌های FOXO1 (٤/۱ برابر)، TOR (۳/۹ برابر)، S6K1 (۳/۳ برابر) افزایش یافت و بیان ژن‌های InR (٤/٦ برابر) و Glut1 (۷/۵ برابر) کاهش یافت. به‌طور کلی نتایج پژوهش حاضر نشان داد القای کبدچرب در مرغان تخم‌گذار پس از اوج سبب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت به انسولین شد.

کلیدواژه‌ها: بیان ژن، تزریق، کبد چرب، مرغ تخم‌گذار، مقاومت به انسولین.

The effect of fatty liver induction with estradiol injection on expression of insulin resistance-related genes in liver of post-peak laying hens

Eisa Dirandeh[1*], Mohammad Kazemifard[1], Tanaz Saberifar[2]
1. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
2. Former Ph.D. Student, Department of Genetics and Physiology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
Received: January 25, 2022 Accepted: April 9, 2022

Abstract

To investigate the effect of fatty liver on insulin resistance in the liver of laying hens, an experiment using 80 laying hens of commercial line strains (w-36) after peak production (age 43 weeks) for eight weeks were performedin a completely randomized design with two treatments. The experimental treatments included control group (no injection) and the estradiol group (injection of two mg estradiol benzoate per kg body weight). In order to induce fatty liver disease, the injection of 17-beta estradiol started from the third week of experiment (age 46), and was performed three times a week for 21 days. Blood samples were taken to evaluate the concentration of triglycerides, cholesterol and liver enzymes (aspartate transaminase (AST), alanin transaminase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) at the end of the experiment using 20 hens from each treatment. At the end of experiment, five hens of each treatment were selected and sacrificed, then 50 g of liver tissue was removed to study gene expression of insulin receptor (InR), glucose transporter1 (Glut1), sterol regulatory element binding protein (SREBP1), Ribosomal S6 kinase1 (S6K1), Target of Rapamycin (TOR) and Forkhead box protein O1 (FOXO1). The results showed that the injection of estradiol induced fatty liver and increased plasma concentrations of cholesterol and triglyceride as well as activity of AST, ALT and ALP. In hens with fatty liver, expression of FOXO1 (4.1-fold), TOR (3.9-fold), S6K1 (3.3-fold) genes increased, and conversely, expression of InR (4.6-fold), Glut1 (7.5-fold) decreased. In conclusion results of the present study showed that the fatty liver induction in laying hens increased expression of insulin resistance-related genes.

Keywords: Gene expression, Fatty liver, Injection, Insulin resistance, Laying hen.

* نویسنده مسئول
Email: E.dirandeh@sanru.ac.ir

مقدمه

در مرغ‌های تخم‌گذار مسن درصد بیماری‌هایی هم‌چون کبدچرب و پوکی استخوان افزایش می‌یابد که با کاهش عملکرد تولیدمثلی همراه است. بیماری کبدچرب، یکی دیگر از مشکلات مرغ‌های تخم‌گذار در سنین بالا می‌باشد. زمانی‌که ساخت چربی در کبد بیش‌تر از ظرفیت تراوشی و سوخت‌وساز آن باشد، تری‌گلیسرید در کبد تجمع یافته و منجر به کبد چرب می‌شود [۱۸]. با توجه به این‌که کبد محل اصلی ساخت چربی زرده می‌باشد، لذا هرگونه اختلال در عملکرد کبد می‌تواند ساخت چربی زرده در کبد را تحت تأثیر قرار دهد. در مرغ‌های تخم‌گذار، کبدچرب در اوج تولید امری معمول می‌باشد. به‌نظر می‌رسد کمبود استروژن تشدیدکننده این عارضه باشد. در عارضه کبد چرب، به‌دلیل آسیب سلول‌های کبدی سایر وظایف سلول‌های مذکور نیز مختل می‌شود [۱۵]. برای مثال، مرحله اول هیدروکسیلاسیون ویتامین D که در کبد انجام می‌شود، با تخریب سلول‌های کبدی مختل شده در نتیجه، با کاهش تولید ویتامین D_3 متابولیسم کلسیم وفسفر مختل می‌شود [۱۸]. اختلال در متابولیسم کلسیم و فسفر نیز به نوبه خود منجر به اختلال در استخوان‌سازی و کاهش کیفیت پوسته تخم‌مرغ می‌شود [۱۸]. تغذیه مرغ‌های تخم‌گذار پس از ۳٦ هفتگی با جیره دارای انرژی زیاد (۱۲/۹۷ مگاژول بر کیلوگرم) و پروتئین کم (پروتیئن خام، ۱۲ درصد) سبب القای کبد چرب شد[۲۵]. تزریق استرادیول بنزوات به مقدار دو میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در مرغ‌های تخم‌گذار به‌صورت تزریق داخل ماهیچه‌ای، سه روز قبل از بیوبسی کبد، موجب القای کبد چرب در پرندگان شد [۲۰].

انسولین یکی از مهم‌ترین هورمون‌های آنابولیک شناخته شده بوده و برای رشد، تکامل و تنظیم سوخت‌وساز ضروری است [٦ و ۱۹]. اتصال انسولین به گیرنده خود (InR) سبب فعال‌شدن مجموعه‌ای از مولکول‌ها می‌شود که به‌طور کلی به‌عنوان مسیر پیام‌دهی PI3K/Akt/TOR شناخته می‌شود و مسئول بسیاری از کنش‌های متابولیک انسولین است [٤ و ۲۱]. فاکتورهای متعددی وجود دارند که می‌توانند پیام‌دهی انسولین را مهار و در نهایت سبب تجمع تری‌گلیسرید در کبد و اختلال در هموستاز گلوکز شوند [٤-٦]. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند مقاومت به انسولین به مقدار بسیار زیادی با کبدچرب در ارتباط است [۵]. گزارش شده القای کبدچرب در مرغان تخم‌گذار با جیره دارای انرژی زیاد و پروتئین کم سبب تشدید مقاومت به انسولین شد [۲۵]. فاکتورهای متعددی وجود دارند که می‌توانند پیام‌دهی انسولین را مهار و در نهایت سبب تجمع تری‌گلیسرید در کبد و اختلال در هموستاز گلوکز شوند [٤-٦]. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند مقاومت به انسولین به مقدار بسیار زیادی با کبدچرب در ارتباط است [۵]. گزارش شده القای کبدچرب در مرغان تخم‌گذار با جیره دارای انرژی زیاد و پروتئین کم سبب تشدید مقاومت به انسولین شد [۲٤]. پژوهش‌های پیشین نشان دادند سوخت‌وساز چربی و گلوکز در مرغ ویژگی‌های خاصی دارد [٦ و ۷]. غلظت گلوکز در طیور در مقایسه با پستانداران با توده بدنی یکسان دو تا چهار برابر است، مقاومت به انسولین نیز همین شرایط را دارد [٦-۸]. ویژگی خاص دیگر ساخت چربی است که به‌طور عمده در کبد رخ می‌دهد، به‌طور معمول چربی پس از هضم در انتروسیت‌های روده به شیلومیکرون تبدیل می‌شود و وارد عروق می‌شود که به اندام‌های مختلف می‌رود ولی عمده این چربی در کبد انباشت می‌شود، در کبد با اضافه‌شدن لیپوپروتئین‌ها به شکل VLDL از کبد خارج می‌شود و در نهایت به شکل LDL یا HDL به کبد برمی‌گردند و این روند تکرار می‌شود، هم‌چنین فعالیت آنزیم‌های لیپوژنیک

در بافت چربی طیور گوشتی در مقایسه با پستانداران بسیار کم می‌باشد قابل ذکر است طیور فاقد آنزیم ناقل گلوکز (Glut4) می‌باشند، این آنزیم به‌طور عمده در بافت عضلانی و چربی بیان شده و در انتقال گلوکز در پاسخ به انسولین نقش کلیدی دارد. آنزیم ناقل گلوکز از داخل سلول (محلی که ذخیره می‌شود) به غشای پلاسمایی منتقل می‌شود (محلی که جابه‌جایی گلوکز تسهیل می‌شود) [١٦].

به همین دلیل پرندگان در معرض افزایش گلوکز خون هستند که می‌تواند اثرات منفی بر کبد داشته باشد. به همین دلیل سوخت‌وساز گلوکز و انسولین در پرندگان نقش کلیدی بر پیشرفت کبدچرب در مرغان تخم‌گذار ایفا می‌کند [٢٥]. لذا هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر القای کبد چرب با تزریق استرادیول بر بیان ژن‌های دخیل در مقاومت به انسولین در کبد مرغ‌های تخم‌گذار پس از اوج تولید بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مزرعه تحقیقاتی طیور دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری با استفاده از ٨٠ قطعه مرغ تخم‌گذار سویه تجاری های لاین (w-36) پس از اوج تولید (سن ٤٣ هفته) به‌مدت هشت هفته در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار، ١٠ تکرار و چهار مشاهده در هر تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل ١- گروه شاهد (بدون تزریق) و ٢- گروه استرادیول (تزریق دو میلی‌گرم به‌ازای هر کیلوگرم وزن بدن استرادیول بنزوات (شرکت ابوریحان، ایران)) بود. تزریق استروژن به جهت القاء بیماری کبد چرب، از هفته سوم پرورش آغاز و به‌صورت داخل ماهیچه‌ای در ناحیه سینه پرنده، سه بار در هفته و به‌مدت ٢١روز انجام شد [٢٠]. میانگین وزن مرغ‌های انتخاب شده ١٥٥٠ گرم و میانگین تولید تخم‌مرغ حدود ٦٤ درصد بود. جیره‌های غذایی گروه‌های آزمایشی یکسان براساس توصیه‌های مواد مغذی راهنمای پرورش سویه های‌لاین (w-36) پس از اوج تولید بود. جیره‌های غذایی براساس ذرت- کنجاله سویا و با در نظرگرفتن مقدار ١٠٠ گرم خوراک مصرفی روزانه برای هر قطعه مرغ توسط نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA تنظیم شد. سیستم دانخوری به‌صورت ناودانی و از جنس ورق گالوانیزه و سیستم آب‌خوری به صورت نیپل بود. برای تأمین روشنایی سالن، از لامپ‌های ١٠٠ ولت استفاده شد. فاصله بین لامپ‌ها در سالن ١/٥ برابر ارتفاع لامپ‌ها از سطح یا قفس بود. برنامه نوری براساس راهنمای پرورش سویه های‌لاین (w-36) شامل ١٥ ساعت روشنایی و نه ساعت تاریکی بود. لامپ‌ها هر روز ساعت شش صبح روشن و ساعت نه شب خاموش شدند. برای تهویه سالن از هواکش استفاده شد. هواکش‌ها در عرض سالن داشتند.

خون‌گیری جهت بررسی غلظت پلاسمایی تری‌گلیسرید، کلسترول و آنزیم‌های آلکالین‌فسفاتاز (ALP)، آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین‌آمینوترانسفراز (ALT) در انتهای آزمایش با استفاده از دو قطعه در هر واحد آزمایشی (٢٠ قطعه از هر تیمار) انجام شد.

هشت ساعت پیش از خون‌گیری، خوراک‌دهی متوقف شد. سپس با رعایت اصول بهداشتی با استفاده از سرنگ‌های مخصوص مقدار دو میلی‌لیتر خون از محل ورید بال چپ گرفته شد. خون اخذشده به داخل لوله‌های آزمایش محتوای ماده ضد انعقاد (EDTA) منتقل و سپس جهت جداسازی پلاسما بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها به‌مدت ٢٠ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (مدل یونیورسال، کشور آمریکا) با سرعت ٣٥٠٠ دور در دقیقه قرار گرفت. پلاسمای جداسازی‌شده تا زمان آنالیز در دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. مقادیر پلاسمایی گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسرید، ALP، AST و ALT در آزمایشگاه با دستگاه اتوآنالایزر (مدل تکنیکون

کشور آمریکا) و با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون (تهران، ایران) اندازه‌گیری شدند. حساسیت کیت و ضریب پراکنش درونی محاسبه شده به‌ترتیب برای کلسترول پنج میلی‌گرم در دسی‌لیتر و ۷/۷۳ درصد، تری‌گلیسرید سه میلی‌گرم در دسی‌لیتر و ٦/۲۱ درصد،ALP یک میلی‌گرم در دسی‌لیتر و ۳/۱۹ درصد، AST چهار واحد بین‌الملل در لیتر و ۵/۹۱ درصد، ALT چهار واحد بین‌الملل در لیتر و ۷/۷۳ درصد بود. نمره‌دهی رنگ کبد و بر مبنای سالم (یک) تا مبتلا به عارضه کبدچرب شدید (پنج) صورت گرفت [۲].

برای بررسی بیان ژن‌های مؤثر در مقاومت به انسولین در انتهای آزمایش دو قطعه در هر تکرار (۲۰ قطعه از هر تیمار) کشتار شد و نمونه کبد به مقدار ۵۰ گرم برداشته شد. نمونه‌های جمع‌آوری‌شده پس از انتقال به آزمایشگاه در فریزرو در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا بیان ژن‌های مرتبط ارزیابی شود. برای استخراج RNA کل از بافت کبد از کیت RNAxplus (شرکت سیناکلون، ایران) استفاده شد. برای تعیین خلوص RNA استخراج‌شده، از ژل آگاروز دو درصد استفاده شد. برای ساخت cDNA از آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (شرکت بایونیر، آلمان) استفاده شد. برای انجام واکنش Real-Time PCR از دستگاه Corbet (مدل ۳۰۰۰، کشور استرالیا) و آغازگرهای اختصاصی SYBR®Green PCR QuantiNovaTM شرکت کیاژن (ایران) استفاده شد. با استفاده از اطلاعات موجود در بانک ژن NCBI (National Center for Biotechnology Information)، توالی و طول قطعه‌های موردنظر بررسی شدند که در جدول (۱) این اطلاعات شرح داده شده‌اند. برای عملکرد بهتر، واکنش‌ها در حجم ۱۵ میکرولیتر دارای ۷/۵ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین (2x SYBR Green PCR Master Mix)، یک میکرولیتر cDNA، یک میکرولیتر آغازگر اختصاصی رفت، یک میکرولیتر آغازگر اختصاصی برگشت و ٤/۵ میکرولیتر آب بدون RNA تنظیم شدند. ژن ß-Actin به‌عنوان ژن کنترل در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. تعداد چرخه‌ها در Real-Time PCR ٤۰ چرخه بود.

جدول ۱. آغازگرهای مورداستفاده در فرایند Real-Time PCR

نام ژن	توالی آغازگر	شماره بانک ژن	طول قطعه (bP)
InR	F: CAAACGGTGACCAAGCCTCA R: CATCCTGCCCATCAAACTCCG	AF111857	۱۸٦
TOR	F: CCAGGATTCTTCGGACTA R: CCATCACAAACCCTTATT	XM_417614	۲٤۹
S6K1	F: CATGATTTCCAAACGACCAGA R: AGTAAACCAAACAAGCCCTCC	NM_001030721	۱۳٤
FOXO1	F: ATGCGACCTCTGGTAATA R: AAGTGTAGGCAAATCGTC	NM_204328	۳۰۷
GLUT-1	F: TAGTACTGGAGCAGGTGGCAGA R: CGGCACAAGAATGGATGAAA	NM-205209	۱۲٤
SREBP-1	F: CATTGGGTCACCGCTTCTTCGTG R: CGTTGAGCAGCTGAAGGTACTCC	NM_204126.2	۲۳۷
ß-Actin	F: CATCACCATTGGCAATGAGAGG R: GCAAGCAGGAGTACGATGAATC	L08165	۱۹٤

InR: گیرنده انسولین OR: هدف راپامایسین، S6K1: کیناز ۱ریبوزمی S6، FOXO1: پروتئین O1 جعبه ،Glut1: ناقل گلوکز شماره ۱، SREBP1: پروتئین تنظیم‌کننده انتقال استرول، ß-Actin: بتا اکتین.

مقادیر مربوط به چرخه آستانه (CT) حاصل برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن‌ها، وارد نرم‌افزار Excel شد. برای اندازه‌گیری بیان نسبی ژن‌ها از روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ استفاده شد. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از آزمون t در نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۱/۹) انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد تزریق استرادیول سبب افزایش نمره رنگ کبد (شاخص کبد چرب) شد و در این مرغان غلظت تری‌گلیسرید، کلسترول و فعالیت AST، ALT و ALP افزایش یافت (جدول ۲، P<۰/۰۵). بیماری کبد چرب یک بیماری رایج در مرغان تخم‌گذار بوده که سبب مرگ و کاهش ناگهانی تولید تخم‌مرغ شده است. اگرچه سازوکار مولکولی آن به درستی مشخص نشده است [۲۲]. پژوهش‌های پیشین نشان داده‌اند تغذیه، شرایط هورمونی و وضعیت فیزیولوژیک، شرایط محیطی، درجه حرارت و ورودی‌های متابولیک در ایجاد کبدچرب دخالت دارند [۲]. در پژوهش حاضر افزایش غلظت آنزیم کبدی ALT و نیز مشاهدات پس از کشتار شامل کبد رنگ‌پریده و شکننده و نیز تورم به‌همراه نقاط خونریزی روی کبد و انباشت چربی در ناحیه شکم بیانگر مؤثربودن استفاده از استرادیول برای القای کبد چرب در مرغ‌های تخم‌گذار پس از اوج تولید بوده است. در مرغ‌های تخم‌گذار، لیپوژنز کبدی به‌طور وسیعی تحت تأثیر استروژن و به‌جهت پاسخ‌گویی به درخواست ویتلوژنز افزایش یافته است [۱]. در این پژوهش، استرادیول احتمالاً لیپوژنز کبدی را به مقدار بسیار زیادی افزایش داد، به‌طوری‌که این مقدار لیپوژنز از ظرفیت ساخت و ترشح لیپوپروتئین‌ها فراتر بوده و منجر به تجمع چربی در سلول‌های کبدی شد.

استفاده از استرادیول خارجی جهت القای کبد چرب در مرغ‌های تخم‌گذار با سن ۳۵ هفته، موجب افزایش غلظت کلسترول و تری‌گلیسرید پلاسما و آنزیم ALT کبدی می‌شود [۱۸]. گزارش شده است که در مرغ‌های تخم‌گذار مبتلا به کبد چرب القا شده به‌کمک جیره‌ای با انرژی بالا و پروتئین پایین پس از اوج تولید، مقادیر تری‌گلیسرید و کلسترول سرم خون در مقایسه با تیمار شاهد افزایش داشته است [۲۵]. در پژوهشی دیگر، گزارش شده است که استفاده از استرادیول بنزوات به میزان دو میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن به‌منظور القای کبد چرب، غلظت‌های کلسترول، تری‌گلیسرید و فسفولیپید در پلاسمای خون مرغ‌های تخم‌گذار پس از اوج تولید (سن ٤٣ هفتگی) را افزایش داد [۱۵].

جدول ۲. تأثیر تزریق استرادیول بر غلظت فراسنجه‌های خونی و فعالیت آنزیم‌های کبدی در مرغان تخم‌گذار

شاخص	تیمار		S.E.M	P-Value
	شاهد	تزریق استرادیول		
گلوکز (mmol/l)	۷/۲۵	۸/۳٦	۰/۰٤	۰/۰۲
انسولین (mU/L)	۲/۲۳	۳/٦٦	۰/۲۹	۰/۰۱
کلسترول (mmol/l)	٦/۰۱	۷/٥٦	۰/۰۹	۰/۰۲
تری‌گلیسرید (mmol/l)	۲۳/٥٦	۲۹/۹۳	۰/۳۱	۰/۰۱
آسپارتات‌آمینوترانسفراز (U/L)	۲۱۰/۲٥	۲۲۰/٦۲	۸/۷۰	۰/٦۱
آلانین‌آمینوترانسفراز (U/L)	٤/٤۷	۷/۱۹	۰/۱۹	۰/۰۱
آلکالین‌فسفاتاز (U/L)	۱۸۰/٥۹	۲۲٦/۳۰	۱۰/۲۱	۰/۰۱
نمره رنگ کبد	۲/۰۷	۳/۲۰	۰/۱	۰/۰۱

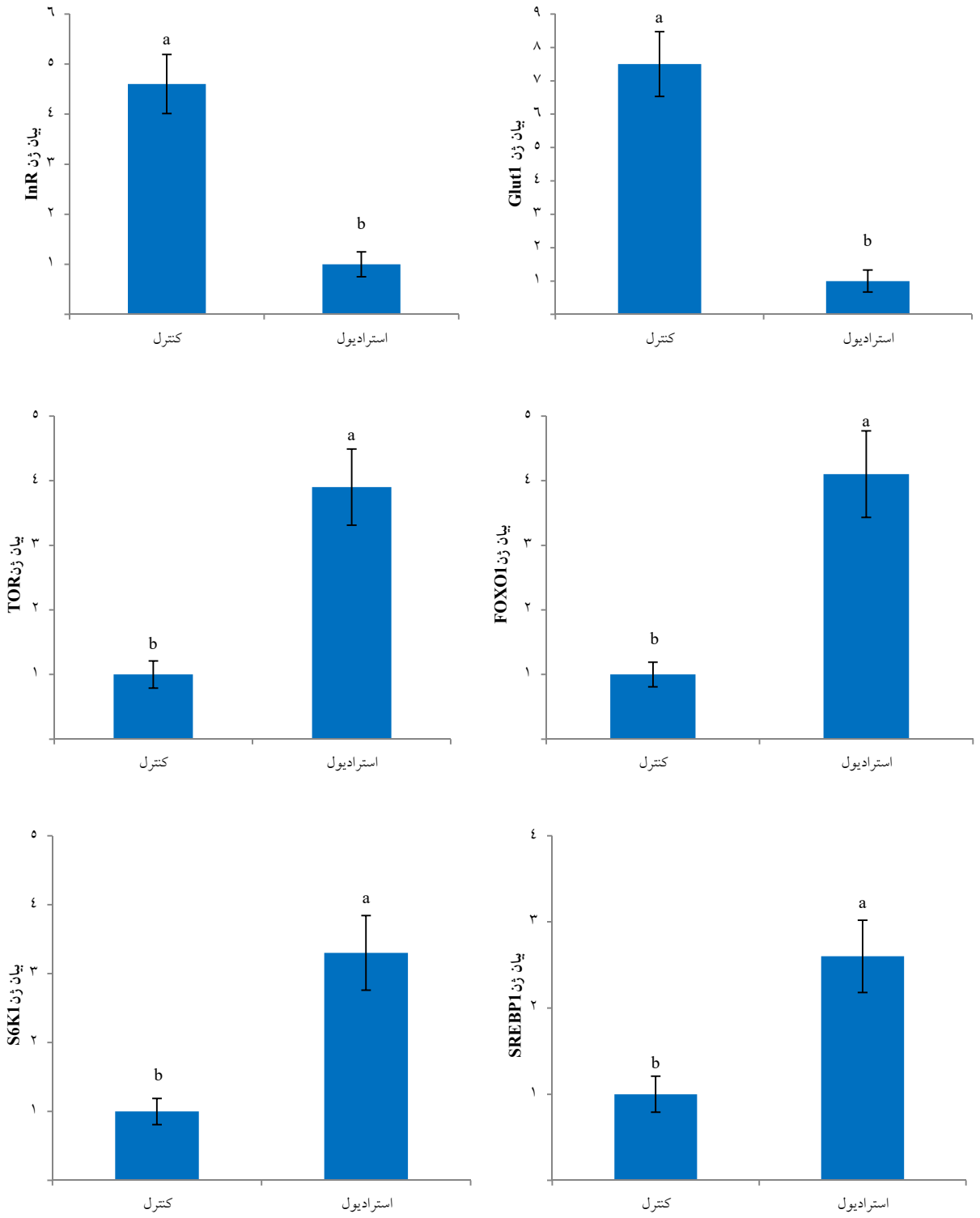
در همین راستا، گزارش شده که القا کبد چرب به‌کمک جیره‌ای با انرژی بالا منجر به افزایش مقادیر کلسترول، تری‌گلیسرید و آنزیم‌های کبدی ALT و AST شده است [۱۳]. پژوهش‌های قبلی نشان داد که استفاده از ۱۷-بتا استرادیول باعث تنظیم گیرنده‌های استروژنی در کبد می‌شود [۱۲]. نشان داده شده است که با افزایش سن پرنده مقدار ترشح استروژن کاهش پیدا می‌کند که باعث عدم تعادل بین پراکسیدازها و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌شود و این عدم تعادل باعث افزایش آسیب اکسیداتیو در سلول‌های کبدی می‌شود [۲۳].

افزایش تولید اسیدهای چرب و تری‌گلیسرید در کبد به‌دنبال استفاده از استرادیول بنزوات در مرغ‌های تخم‌گذار، منجر به پدیدارشدن ذرات چربی در سرم خون این پرندگان می‌شود [۹]. استرادیول سبب افزایش ساخت و ترشح لیپوپروتئین‌های با چگالی خیلی پایین (VLDL) می‌شود. در شرایط طبیعی مولکول‌های VLDL مسئول خارج‌کردن چربی‌ها از کبد هستند. اما با تزریق استرادیول و تحریک لیپوژنز کبدی، ساخت و انتقال تری‌گلیسریدها و اسیدهای چرب بلند زنجیر در کبد دچار مشکل می‌شود که پیامد آن انباشت چربی در کبد و نیز افزایش این ذرات در پلاسمای خون است [۱۳].

انسولین هورمون کاهنده گلوکز خون در بدن است. این هورمون از طریق اتصال به گیرنده‌های اختصاصی خود در سطح سلول و فعال‌کردن آن سبب تنظیم سوخت و ساز گلوکز و چربی‌ها و هم‌چنین ساخت پروتئین‌ها از طریق مولکول‌های پروتئین پایین‌دست (Downstream) می‌شود [۲۱]. انسولین باعث تحریک اندام‌های احشایی برای گرفتن گلوکز از پلاسما می‌شود در حالی‌که سبب مهار خروج گلوکز از کبد و تبدیل آن به گلیکوژن یا استیل کوآنزیم آ می‌شود [۱ و ۲۱]. زمانی‌که مقاومت به انسولین در بدن اتفاق می‌افتد انسولین و مسیر پیام‌دهی آن نمی‌تواند به‌صورت کارآمد فعال شود و سبب تراوش جبرانی می‌شود که به‌دنبال آن تراوش بیش از حد انسولین و کاهش قند خون رخ می‌دهد [۳]. گزارش شده که گلوکوتوکسیته (glucotoxicity) و لیپوتوکسیته (lipotoxicity) تنش اکسیداتیو و آزادسازی فاکتورهای التهابی را تشدید می‌کند که به اختلال در عملکردهای سلولی در انسان منجر می‌شود [۱۷]. در نتیجه، انتظار می‌رود مقاومت به انسولین سبب اختلال در هموستاز متابولیک گلوکز، لیپیدها و پروتئین در بدن شده و به‌دنبال آن تنش اکسیداتیو و التهاب ایجاد شود که مشابه حالتی است که کبد یا اندامی آسیب ببیند یا زخم شود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد سطح گلوکز و انسولین خون در مرغان مبتلا به کبد چرب بیش‌تر از گروه شاهد بود که نشان‌دهنده تراوش بیش از حد انسولین (hyperinsulinaemia) و قند (hyperglycaemia) مشابه با مقاومت به انسولین است. در پژوهشی مشابه گزارش شد القای کبد چرب با استفاده از جیره پر انرژی و کم پروتئین در مرغان تخم‌گذار سبب مقاومت به انسولین و افزایش سیتوکین‌های پیش‌التهابی مانند اینترلوکین-٦ و فاکتور نکروزه‌کننده تومور آلفا شد [۲۵].

در مرغان مبتلا به کبد چرب بیان ژن‌های FOXO1 (٤/١ برابر)، TOR (٣/٩ برابر)، S6K1 (٣/٣ برابر) و SREBP1 (٢/٦ برابر) افزایش یافت و بیان ژن‌های InR (٤/٦ برابر)، Glut1 (٧/٥ برابر) کاهش یافت (شکل ١، P<٠/٠٥).

کاهش بیان ژن گیرنده (InR) انسولین در پژوش حاضر در مرغان مبتلا به کبد چرب (گروه استرادیول) نشان‌دهنده بروز مقاومت به انسولین و اختلال در مسیر پیام‌دهی InR/PI3K/AKT است. عوامل زیادی مانند تنش اکسیداتیو و التهاب می‌تواند سبب مهار مسیر پیام‌دهی انسولین شود [١٤]. فرون بر این، بیان TOR و S6K1 که افکتورهای پایین‌دست در مسیر پیام‌دهی PI3K/AKT هستند در پژوهش حاضر در گروه کنترل کاهش یافت.



شکل ۱. تأثیر تیمارهای آزمایشی گروه شاهد تزریق استرادیول بر نسبت بیان ژن‌های (FOLD) گیرنده انسولین (InR)، هدف راپامایسین (TOR)، کیناز ۱ ریبوزمی S6 (S6K1)، پروتئین O1 جعبه (FOXO1)، ناقل گلوکز شماره ۱ (Glut1) و پروتئین تنظیم‌کننده انتقال استرول (SREBP1). a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار هستند (P≤۰/۰۵).

TORیک حس‌گر مواد مغذی سلولی محسوب می‌شود که تحت تأثیر گلوکز و اسیدهای آمینه دریافتی از جیره می‌تواند بیان آن تحریک شود [۲۵]. تزریق استرادیول سبب مقاومت به انسولین شده و این کار را از طریق کاهش حساسیت به انسولین و کاهش بیان گیرنده آن انجام داده است که همین امر سبب افزایش غلظت گلوکز شده است و افزایش گلوکز سبب افزایش بیان TOR و S6K1 در گروه استرادیول شده است. تغییر سطح انرژی جیره ممکن است سبب مهار فعالیت AMPK شود که منجر به افزایش فعالیت TORc1 می‌شود. بنابراین فسفریلاسیون S6K1 به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم توسط انرژی سلولی و سطوح مواد مغذی تنظیم می‌شود. پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که TORc1 و S6K1 ممکن است به‌صورت ویژه سطح فسفریلاسیون پروتئین AKT را از طریق بازخورد منفی کاهش دهد که به‌نوبه خود اختلال در مسیر پیام‌دهی InR/PI3K/AKT را تشدید می‌کند [۱۰].

FOXO1 یک فاکتور رونویسی است که به‌طور منفی از طریق انسولین تنظیم می‌شود. FOXO1 می‌تواند از طریق مسیر پیام‌دهی AKT از هسته به سیتوپلاسم جابه‌جا شده و در تنظیم ساخت گلوکز در کبد و ساخت VLDL و اسیدهای چرب شرکت کند [۱۱]. افزون بر این، SREBP1 یک ژن کلیدی در شبکه ژن‌های مرتبط با ساخت لیپید در کبد است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تنظیم افزایشی (upregulation) بیان ژن SREBP1 با بیمار کبدچرب غیرالکلی در ارتباط است [۱۱]. گزارش شده رسوراتول (Resveratrol) می‌تواند بیان SREBP1، یک ژن مرتبط با ساخت چربی را از طریق تنظیم مسیر پیام‌دهی Sirt1-FOXO1 برای مهار تغییرات پاتولوژیک چرب در سلول‌ها را کاهش دهد [۱۱]. در تطابق با نتایج پژوهش حاضر بیان ژن FOXO1 و SREBP1 در مرغان مبتلا به کبد چرب افزایش یافت [۲٤].

اختلال در سوخت‌وساز گلوکز از شاخص‌های مهم مقاومت به انسولین است. انسولین به‌طور اختصاصی به گیرنده‌های خود در سطح سلول متصل می‌شود تا AKT را فعال کند و به‌دنبال آن ساخت گلیکوژن‌ها و بیان ژن انتقال‌دهنده گلوکز (Glut) در غشای سلول را افزایش می‌دهد. Glut1 به‌طور گسترده‌ای در بافت‌ها و سلول‌های مختلف بیان می‌شود و پروتئین اصلی برای حمل گلوکز در سراسر سد بافتی است. گزارش شده که اگرچه پروتئین Glut1 نسبت به تحریک انسولین در پستانداران حساس نبود، اما در میوبلاست‌های مرغ تحت تیمار با انسولین تنظیم شد [۲٤]. کاهش بیان Glut1 در کبد مرغان مبتلا به کبد چرب کاهش مصرف قند خون را در این مرغان پیشنهاد می‌کند.

به‌طورکلی، نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد القای کبدچرب در مرغان تخم‌گذار پس از اوج سبب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت به انسولین می‌شود که می‌تواند سبب کاهش راندمان تولیدی شود. لذا استفاده از راه‌کارهایی که سبب کاهش شدت کبد چرب شود در افزایش راندمان تولیدی بسیار تأثیرگذار خواهد بود.

تشکر و قدر دانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۵-۱٤۰۰-۰۳ انجام شد که به این وسیله تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مورد استفاده

1. Chen W, Balland E and Cowley MA (2017). Hypothalamic Insulin Resistance in Obesity: Effects on Glucose Homeostasis. Neuroendocrinology 104: 364-381.

2. Choi YI, Ahn HJ and Kang CW (2012). Nutritional and hormonal induction of fatty liver syndrome and effects of dietary lipotropic factors in egg-type chicks. Asian- Australasian Animal Sciences 25: 1145-1152.
3. Craft S (2005). Insulin resistance syndrome and Alzheimer's disease: age- and obesity-related effects on memory, amyloid, and inflammation. Neurobiol Aging 26(Suppl 1), 65-69.
4. Leiria LO, Sollon C, Báu FR, Mónica FZ, D'Ancona CL, De Nucci G, Grant AD, Anhê GF and Antunes E (2013). Insulin relaxes bladder via PI3K/AKT/eNOS pathway activation in mucosa: unfolded protein response-dependent insulin resistance as a cause of obesity-associated overactive bladder. Journal of Physiology 591: 2259-2273.
5. Perry RJ, Samuel VT, Petersen KF and Shulman GI (2014). The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. Nature 510: 84-91.
6. Dupont J, Tesseraud S and Simon J (2009). Insulin signaling in chicken liver and muscle. General and Comparative Endocrinology 163: 52-57.
7. Dupont J, Tesseraud S, Derouet M, Collin A, Rideau V, Crochet S, Godet E, Cailleau-Audouin E, Métayer-Coustard S, Duclos MJ, Gespach C, Porter TE, Cogburn LA and Simon J (2008). Insulin immuno-neutralization in chicken: effects on insulin signaling and gene expression in liver and muscle. Journal of Endocrinology 197: 531-542.
8. Dupont J, Métayer-Coustard S, Ji B, Ramé Ch, Gespach Ch, Voy B and Simon J (2012). Characterization of major elements of insulin signaling cascade in chicken adipose tissue: apparent insulin refractoriness. General and Comparative Endocrinology 176: 86-93.
9. Hermier D, Forgez P, Laplaud PM and Chapman MJ (1988). Density distribution and physiochemical properties of plasma lipoproteins and apolipoproteins in the goose, Anser anser, a potential model of liver steatosis. Journal of Lipid Research 29: 893-907.
10. Hwang SL, Li X, Lee JY and Chang HW (2012). Improved insulin sensitivity by rapamycin is associated with reduction of mTOR and S6K1 activities in L6 myotubes. Biochemical and Biophysical Research Communications 418: 402-407.
11. Kamagate A, Hyun Kim D, Zhang T, Slusher S, Gramignoli R, Strom SC, Bertera S, Ringquist S and Dong HH (2010). FoxO1 links hepatic insulin action to endoplasmic reticulum stress. Endocrinology 151: 3521-3535.
12. Koritnik DR, Koshy A and Hoversland RC (1995). 17B-estradiol treatment increases the levels of estrogen receptor and it's mRNA in male rat liver. Steroids 60: 519-529.
13. Lv ZP, Xing K, Li G, Liu D and Guo YM (2018). Dietary Genistein Alleviates Lipid Metabolism Disorder and Inflammatory Response in Laying Hens with Fatty Liver Syndrome. Frontiers in Physiology 9: 1493.
14. Miller MR, Pereira RI, Langefeld CD, Lorenzo C, Rotter JI, Chen YD, Bergman RN, Wagenknecht LE and Norris JM and Fingerlin TE (2012). Levels of free fatty acids (FFA) are associated with insulin resistance but do not explain the relationship between adiposity and insulin resistance in Hispanic Americans: the IRAS Family Study. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 97: 3285-3291.
15. Saberifar T, Samadi F, Dastar B, Hasani S, Kazmifard M and Ganji F (2021) Enhancement of Productive Performance, Bone Physical Characteristics, and Mineralization of Laying Hens during the Post-Peak Period by Genistein. Archives of Razi 76: 359-362.
16. Seki Y, Sato K, Kono T, Abe H and Akiba Y (2003). Broiler chickens (Ross strain) lack insulin-responsive glucose transporter GLUT4 and have GLUT8 cDNA. General and Comparative Endocrinology 133: 80-87.
17. Shimo N, Matsuoka T, Miyatsuka T, Takebe S, Tochino Y, Takahara M, Kaneto H and Shimomura I (2015). Short-term selective alleviation of glucotoxicity and lipotoxicity ameliorates the suppressed expression of key betacell factors under diabetic conditions. Biochemical and Biophysical Research Communications 467: 948-954.
18. Shini S, Shini R and Bryden WL (2020). Unravelling fatty liver haemorrhagic syndrome: 1. Oestrogen and inflammation. Avian Pathology 49: 87-98.
19. Simon J, Rideau N, Taouis M and Dupont J (2011). Plasma insulin levels are rather similar in chicken and rat. General and Comparative Endocrinology 171: 267-268.
20. Stevenson, L. M. 2012. The estrogenic effects of the soy phytoestrogen genistein on the liver and bone of chickens. PhD thesis. Auburn University.
21. Titchenell PM, Lazar MA and Birnbaum MJ (2017). Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. Trends in Endocrinology and Metabolism 28: 497-505.

22. Trott K, Giannitti F, G Rimoldi, Hill A, Woods L, Barr B , Anderson M and Mete A (2014). Fatty liver hemorrhagic syndrome in the backyard chicken: a retrospective histopathologic case series. Veterinary Pathology 51: 787-795.
23. Vina J, Borras C and Gomez MC (2006). Role of reactive oxygen species and (phyto) oestrogens in the Modulation of adaptive response to stress. Free Radicl Research 40: 111-119.
24. Zhao JP, Bao J, Wang XJ, Jiao HC, Song ZG and Lin H (2012). Altered gene and protein expression of glucose transporter1 underlies dexamethasone inhibition of insulinstimulated glucose uptake in chicken muscles. Journal of Animal Science 90: 4337-4345.
25. Zhuang Y, Xing C, Cao H, Zhang C, Luo J, Guo X and Hu G (2019). Insulin resistance and metabonomics analysis of fatty liver haemorrhagic syndrome in laying hens induced by a highenergy low-protein diet. Scientific Reports 9: 10141.